

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 21620101152310

UDC



硕 士 学 位 论 文

利用质谱技术筛选 RIP3 激酶下游底物

Identification of Downstream substrates of RIP3 kinase by mass spectrometry

李洁

指导教师姓名: 韩家淮 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 6 月

答辩委员会主席: 尤涵教授

评 阅 人:

2012 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题
(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实
验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号
内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,
可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘 要

RIP3作为受体相互作用蛋白家族（Receptor interacting-protein RIPs）重要的一员，是具有特异的丝氨酸（Serine）/苏氨酸（Threonine）激酶活性的蛋白。研究表明，RIP3是TNF诱导的细胞凋亡与细胞坏死相互转换的分子开关，RIP3是TNF诱导多种细胞（如L929细胞、N细胞、MEF细胞）的坏死所必需的。因此，RIP3在诱导细胞死亡方面有着重要的作用。虽然RIP3在调控细胞坏死发挥着重要作用，但其作为一个磷酸激酶，对其下游调控的底物却知之甚少。哪些蛋白会被RIP3及其下游激酶磷酸化，在介导细胞死亡过程中RIP3与哪些蛋白相互作用，RIP3介导细胞死亡的分子机制等科学问题亟待解决。

因此本论文试图使用定量磷酸化组的方法去寻找RIP3激酶的底物，在研究中，本论文以来源于RIP3野生型小鼠和RIP3敲除小鼠的原代腹腔巨噬细胞和永生化的小鼠胚胎纤维原细胞为研究对象，分别用TNF和LPS刺激细胞，然后比较RIP3野生型成纤维细胞和RIP3敲除型成纤维细胞及野生型巨噬细胞和RIP3敲除型巨噬细胞的磷酸化蛋白组的差异。文章利用一系列技术，如SILAC（稳定同位素标记的氨基酸细胞培养）及其spike-in SILAC技术、FASP（超滤管辅助样品制备）、IMAC（金属离子偶联亲和层析）、HILIC（亲水相互作用亲和层析）以及纳升液相串联质谱，深入地分析了RIP3野生型细胞和RIP3敲除型细胞之间磷酸化蛋白组的不同，而且本论文证实这种方法确实可行，所得数据也具有可信性。本研究鉴定到巨噬细胞中4306个蛋白的14057个磷酸化肽段和MEF细胞中1785个蛋白的4732个磷酸化肽段，其中在巨噬细胞和MEF细胞中总共筛选到14081个磷酸化位点。这些磷酸化位点中有6131个已知的磷酸化位点，而其中另外7950个磷酸化位点到目前为止还未被发现。同时研究中又利用生物信息学分析揭示了RIP3激酶及其下游激酶可能的底物识别基序，其中pSXP motif很可能是RIP3特异识别的基序。本论文的研究工作筛选到了一系列RIP3激酶的潜在底物，为后续的深入研究打下了基础。

关键词：稳定的同位素标记技术；受体相互作用蛋白 3；下游底物

Abstract

RIP3 plays a key role in the receptor-interacting protein (RIP) family of serine/threonine protein kinases. According to recent research, receptor-interacting protein 3 (RIP3) is an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. Meanwhile, it is required for TNF-induced necrosis in cells such as L929, N cell and MEF. Therefore, RIP3 is a key kinase in cell death signaling pathway. However, the research about function of RIP3 is still on the exploratory stage, there are many problems to be solved, such as downstream substrates of RIP3 and its downstream kinases, the proteins that have interaction with RIP3 in RIP3-dependent necrosis and the molecular mechanism afterward.

In order to find the downstream substrates of RIP3, we compare the phosphoproteome between RIP3^{+/+} and RIP3^{-/-} macrophages and MEFs. We extended the application of the spike-in strategy to non-proliferating primary macrophage cells. Since MEF cells can proliferate in vitro, SILAC (termed canonical SILAC in this manuscript to distinct it from spike-in SILAC) was used in analyzing their phosphoproteomes. Our results showed that spike-in SILAC coupled with FASP digestion, IMAC-HILIC fractionation and nano-LC-MS/MS is a reliable workflow for quantifying phosphopeptides from non - proliferating primary cells. In total, 14,057 distinct phosphopeptides were identified and mapped to 4,306 proteins in LPS-stimulated macrophages, meanwhile 4,732 distinct phosphopeptides were identified and mapped to 1,785 proteins in TNF-stimulated MEFs. And among these phosphosites, 6,131 phosphosites were known, whereas 7,950 phosphosites have not been identified before. Besides, we also analyzed the phosphorylation motifs which likely to be recognized by RIP3 and its downstream kinases using Motif-X software. And we find it is highly possible that the pSXP motif is a specific site recognized by RIP3. In this study we provide a large amount of information about potential substrates of RIP3 which is very useful for the future study of RIP3 function.

Keywords: SILAC; RIP3; downstream substrates

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
中文目录.....	III
英文目录.....	VII
第一章 前 言	1
1.1 细胞凋亡和细胞坏死	1
1.1.1 细胞凋亡和细胞坏死的定义.....	1
1.1.2 细胞凋亡和细胞坏死的机制.....	2
1.1.2.1 细胞凋亡的机制.....	2
1.1.2.2 细胞坏死的机制.....	3
1.1.3 细胞凋亡和死亡的相关研究.....	3
1.1.3.1 细胞凋亡与细胞坏死之间的联系.....	3
1.1.3.2 坏死性细胞凋亡.....	4
1.1.3.3 线粒体在细胞凋亡与细胞坏死中的作用.....	4
1.1.3.4 ROS 在细胞坏死中的作用	5
1.2 肿瘤坏死因子 (TNF) 诱导的细胞凋亡和细胞坏死	6
1.2.1 TNF 简介	6
1.2.2 TNF 诱导的细胞凋亡和细胞坏死	7
1.2.3 TNF 诱导的细胞凋亡和细胞坏死及之间的转换及其分子开关 ...	8
1.3 受体相互作用蛋白 3 (RIP3)	9
1.3.1 RIP 家族简介	9
1.3.2 RIP 家族的结构特点	10
1.3.3 RIP3 能诱导某些细胞凋亡	11
1.3.4 RIP3 抑制 NF- κ B 的激活	12
1.3.5 过量表达 RIP3 诱导 NF- κ B 的激活	12
1.3.6 RIP3 是细胞凋亡与细胞坏死相互转换的分子开关	13
1.3.7 RIP3 调节细胞坏死的最新研究进展	14

1.4 磷酸化蛋白质组学	16
1.4.1 磷酸化蛋白质组学的定义.....	16
1.4.2 磷酸化蛋白质组学常用分析和定量方法.....	16
1.4.3 SILAC 和 spike-in SILAC.....	17
1.5 立题背景	18
第二章 材料与方法	20
2.1 实验材料	20
2.1.1 哺乳动物细胞.....	20
2.1.2 实验相关药品和试剂.....	20
2.1.2.1 质谱相关试剂.....	20
2.1.2.2 细胞实验相关试剂.....	21
2.1.2.3 蛋白分析相关试剂.....	21
2.1.3 实验室主要仪器.....	21
2.2 分子相关实验方法	22
2.2.1 质粒载体介绍.....	22
2.2.2 表达质粒的构建.....	23
2.2.2.1 引物设计及 PCR 反应	23
2.2.2.2 限制性内切酶消化 PCR 产物和质粒载体	23
2.2.2.3 DNA 的胶回收	24
2.2.2.4 DNA 的连接反应.....	25
2.2.2.5 PCR 产物的克隆	25
2.2.3 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化.....	25
2.2.3.1 感受态细胞的制备.....	25
2.2.3.2 感受态细胞的转化.....	26
2.2.4 质粒 DNA 的提取	27
2.2.4.1 小量提取质粒 DNA (STET 煮沸法)	27
2.2.4.2 中量提取质粒 DNA (碱裂解法)	27
2.2.4.3 大量提取质粒 DNA (CsCl 密度梯度离心法)	28
2.3 细胞相关实验和方法	29
2.3.1 细胞培养.....	29

2.3.1.1	细胞培养基及相关溶液配制.....	29
2.3.1.2	细胞的培养和传代及同位素标记.....	30
2.3.2	细胞的同位素标记.....	30
2.3.2.1	SILAC-标记培养液的准备.....	30
2.3.2.2	细胞的 SILAC 标记.....	30
2.3.2.3	Spike-in SILAC	31
2.3.3	细胞转染.....	31
2.3.3.1	磷酸钙转染法.....	31
2.3.3.2	稳定表达细胞株的筛选.....	32
2.4	质谱相关实验和方法	32
2.4.1	肽段的酶解及脱盐方法.....	32
2.4.1.1	FASP 酶解	32
2.4.1.2	多肽脱盐.....	34
2.4.2	磷酸化肽段的富集和分离.....	35
2.4.2.1	IMAC Beads 制备	35
2.4.2.2	富集磷酸化肽段.....	36
2.4.2.3	亲水相互作用亲和柱 (HILIC) 分离磷酸化肽段.....	37
2.5	蛋白质相关实验和方法	39
2.5.1	免疫沉淀激酶分析.....	39
2.5.2	免疫共沉淀.....	41
2.5.3	免疫印迹及酸化蛋白检测.....	41
2.5.4	相关溶液配制.....	42
第三章	结果与分析	44
3.1	细胞的选择、处理及其设计思路	44
3.1.1	以小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象.....	44
3.1.2	以小鼠胚胎纤维原细胞 (MEF) 为研究对象	45
3.1.3	细胞内 RIP3 的激活及其激酶活性分析	46
3.2	以小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象实验的结果分析	47
3.2.1	混合磷酸化肽段的 H/L ratio	47

3.2.2	RIP3 ^{-/-} 及 RIP3 ^{+/+} 巨噬细胞中的特异性肽段.....	50
3.2.3	RIP3 ^{-/-} 巨噬细胞与 RAW264.7 细胞中及 RIP3 ^{+/+} 巨噬细胞与 RAW264.7 细胞中具有明显差异的肽段.....	52
3.2.4	RIP3 ^{+/+} 巨噬细胞与 RIP3 ^{-/-} 巨噬细胞中具有明显差异的肽段...	53
3.3	以小鼠胚胎纤维原细胞 (MEF) 为研究对象实验的结果分析	54
3.3.1	RIP3 ^{+/+} 巨噬细胞与 RIP3 ^{-/-} 巨噬细胞中具有明显差异的肽段...	54
3.3.2	SILAC 标记实验与 spike-in SILAC 标记实验的比较.....	55
3.4	Motif-X 分析预测 RIP3 磷酸化下游底物的磷酸化位点.....	59
3.5	五个候选下游底物与 RIP3 的相互作用	60
3.5.1	Myc-RIP3 或 Flag-RIP3 能与 AKTIP、ZBP1、IRS2 和 TSC2 相互作用.....	60
3.5.2	RIP3 可使共表达的 IRS2 发生磷酸化修饰	62
3.6	结果分析与讨论	63
附录 1	图表索引	65
附录 2	缩略语及中英文对照	67
参考文献	72
致谢	83

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Contents in Chinese	III
Contents in English.....	IV
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Apoptosis and Necrosis.....	1
1.1.1 Definition of apoptosis and necrosis.....	1
1.1.2 Mechanism of apoptosis and necrosis.....	2
1.1.2.1 Mechanism of apoptosis	2
1.1.2.2 Mechanism of necrosis	3
1.1.3 the study of cell apoptosis and necrosis	3
1.1.3.1 Relationship between apoptosis and necrosis	3
1.1.3.2 Necroptosis	4
1.1.3.3 Role of mitochondria in apoptosis and necrosis	4
1.1.3.4 Role of ROS in cell death	5
1.2 Apoptosis and Necrosis induced by TNF	6
1.2.1 Introduction of TNF	6
1.2.2 Apoptosis and necrosis induced by TNF	7
1.2.3 Mechanism of the switch between apoptosis and necrosis and the molecular switch	8
1.3 Receptor-interacting protein3 (RIP3).....	9
1.3.1 Introduction of RIPs.....	9
1.3.2 Structural features of RIPs	10
1.3.3 RIP3 can induce apoptosis	11
1.3.4 RIP3 inhibits the activation of NF- κ B	12
1.3.5 Overexpression of RIP3 activates NF- κ B.....	12
1.3.6 RRIP3 is molecular switch between cell apoptosis and necrosis	13
1.3.7 Progress on the necrosis regulated by RIP3	14
1.4 Phosphoproteomics	16
1.4.1 Definition of phosphoproteomics	16
1.4.2 Methods most frequently used in quantitative proteomics.	16
1.4.3 SILAC and spike-in SILAC	17
1.5 Background of this thesis	18
Chapter 2 Materials and methods.....	20
2.1 Experimental materials	20
2.1.1 Mammalian cell lines	20

2.1.2	Drugs and reagents.....	20
2.1.2.1	Mass Spectrometry related reagents	20
2.1.2.2	Cell culture related reagents.....	21
2.1.2.3	Protein analysis related reagents	21
2.1.3	Instruments.....	21
2.2	Experiments and methods for DNA	22
2.2.1.	Introduction of Plasmid vectors	22
2.2.2	Construction of expression plasmid.....	23
2.2.2.1	Primer design and PCR.....	23
2.2.2.2	Digestion of plasmid and DNA with restriction enzyme	23
2.2.2.3	Gel extraction.....	24
2.2.2.4	Ligation reaction	25
2.2.2.5	Cloning of PCR product.....	25
2.2.3	Preparation of competent cell and transformation	25
2.2.3.1	Preparation of competent cell	25
2.2.3.2	Transformation of DNA into competent cell	26
2.2.4	Preparation of plasmid DNA	27
2.2.4.1	Mini-preparation od plasmid DNA.....	27
2.2.4.2	Midi-preparation od plasmid DNA.....	27
2.2.4.3	Maxi-preparation od plasmid DNA	28
2.3	Experiments and methods for cell.....	29
2.3.1	Experiments for cell culture.....	29
2.3.1.1	Media and solutions for cell culture.....	29
2.3.1.2	Cell culture , passage and isotope labeling	30
2.3.2	Stable isotope labeling with amino acids in cell culture	30
2.5.2.1	Preparation of SILAC-media	30
2.5.2.2	Method of stable isotope labeling with amino acids in cell culture	31
2.5.2.3	Spike-in SILAC	31
2.3.3	Transfection	31
2.3.3.1	Calcium phosphate transfection	31
2.3.3.2	Selecton for stable cell line	32
2.4	Mass Spectrometry related experiments	32
2.4.1	Protein Extraction and digestion	32
2.4.1.1	Digestion by Filter-aided Sample Preparation	32
2.4.1.2	Method of peptide desalting.....	34
2.4.2	Phosphopeptide enrichment and fractionation.....	35
2.4.2.1	Preparation of IMAC Beads.....	35
2.4.2.2	Phosphopeptide enrichment	36
2.4.2.3	HILIC Fractionation of phosphopeptide	37
2.5	Experiments and methods for protein	39
2.5.1	Immunoprecipitation and kinase assay	39
2.5.2	Co-immunoprecipitation	41
2.5.3	Western blot	41

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库